

Validación de un método multiresiduo para la determinación de medicamentos veterinarios en trucha y langostino

Resumen

Este estudio se realizó con el objetivo de desarrollar y validar un método para la determinación de 30 medicamentos veterinarios en muestras de trucha y langostino. El método utiliza extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con C18 y detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Se determinó linealidad, veracidad (porcentaje de recuperación), repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio (porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD)), límites de detección (LoD), límites de cuantificación (LoQ), selectividad e incertidumbre. La recuperación varió de 70 a 120% y la repetibilidad y la reproducibilidad fueron menores de 20% de la desviación estándar relativa. La selectividad fue adecuada, sin picos interferentes. Las relaciones iónicas cumplieron con los criterios de confirmación. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron mayores de 0,99, con excepción de la sulfaquinolaxina en langostino ($R^2 = 0,97$). Los LoD y los LoQ variaron entre 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y los valores de incertidumbre entre 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 49 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se analizaron adicionalmente 6 muestras de diferentes mercados de Lima y se detectaron trazas de algunos medicamentos incluidos en el ensayo. El método es adecuado para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios y se recomienda su aplicación en los programas nacionales de monitoreo de la inocuidad de truchas y langostinos provenientes de acuicultura.

Palabras clave: multiresiduos; residuos de medicamentos veterinarios; UPLC-MS/MS; truchas; langostinos.

Validation of a multiresidue method for the determination of veterinary drugs in rainbow trout and shrimp

Abstract

The study was aimed at developing and validate an analysis method to determine residues of 30 veterinary drugs in rainbow trout and shrimp specimens. The method involves extraction in dispersive solid phase with C18 and the subsequent detection through liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Validation was done through determination of linearity, trueness (% of recovery), repeatability and intralaboratory reproducibility, limits of detection (LoD), limits of quantification (LoQ) selectivity and uncertainty. Recovery ranged from 70 to 120% and repeatability and intralaboratory reproducibility were lower than 20%. Selectivity was adequate, without interference peaks. Likewise, the ionic relationships met the confirmation criteria. The linearity was adequate, with determination coefficients (R^2) above 0.99, except for sulfaquinolaxin in shrimp specimens ($R^2 = 0,97$). LoD and LoQ varied from 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Limits of uncertainty ranged from 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 49 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was used to analyze 6 samples from different markets in Lima (Peru), identifying traces of some drugs included in the study. Our results show that the method is adequate for the analysis of veterinary drug residues and allow us to recommend its application in national monitoring programs, to assess the safety of rainbow trout and shrimp specimens from aquaculture.

Key words: Veterinary drug residues; UPLC/MS/MS; rainbow trouts; shrimps.

Validação de um método de multiresíduos para a determinação de medicamentos veterinários em truta e camarão

Resumo

O estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver e validar um método para a determinação de 30 medicamentos veterinários, em amostras de truta e camarão. O método utiliza extração dispersiva em fase sólida com C18 e detecção por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Foram determinados a linearidade, a veracidade (recuperação percentual), a repetibilidade, a reprodutibilidade intralaboratorial, os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ), a linearidade, a selectividade e a incerteza. A recuperação variou de 70 a 120%, a repetibilidade e reprodutibilidade estiveram abaixo do 20% do desvio padrão relativo. A selectividade foi adequada, sem picos de interferentes. As proporções de íons atenderam aos critérios de confirmação. Os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99, com exceção da sulfaoxalina em camarão ($R^2 = 0,97$). LoD e LoQ variavam entre 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e valores de incerteza entre 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 49 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Seis amostras de mercados do Lima foram adicionalmente analisadas e foram detectados vestígios de alguns medicamentos incluídos no estudo. O método é adequado para o análise de resíduos de medicamentos veterinários e sua aplicação é recomendada em programas nacionais de controlo da segurança da truta e do camarão provenientes da aquicultura.

Palavras-chave: multi-resíduos; resíduos de medicamentos veterinários; UPLC-MS/MS; truta; camarão.

Introducción

La acuicultura mundial muestra un incremento anual sostenido, según los reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [1]. La magnitud de extracción de productos provenientes de la pesca es oscilante, con épocas de mayor o menor biomasa marina extraída, en tanto la producción proveniente de la acuicultura es más predecible, puesto que es controlada y el proceso de cría y su rendimiento se pueden modificar a voluntad [2]. En el Perú, las exportaciones acuícolas crecieron un 25,3% en el periodo enero-octubre de 2021, hasta alcanzar 338 millones de dólares estadounidenses y 43.691 toneladas [3].

Sin embargo, los productos acuícolas pueden contener residuos o contaminantes químicos, tales como residuos de medicamentos veterinarios, resultantes del uso intencionado (administración de fármacos para contrarrestar enfermedades) o no intencionado (contaminación ambiental), lo que genera un problema de salud pública y al mismo tiempo pone en riesgo la comercialización de los productos acuícolas, sobre todo en el mercado internacional [3], [4].

Medicamentos veterinarios tales como antibióticos y antiparasitarios cumplen un rol importante en la acuicultura para el tratamiento y prevención de enfermedades transmisibles. Sin embargo, cuando su uso es indiscriminado, cuando no se cumplen los periodos de retiro y las dosis establecidas, o cuando se utilizan sustancias no autorizadas, se pueden originar residuos de estas sustancias en los tejidos comestibles, que pueden causar efectos adversos en la salud humana, desde leves reacciones alérgicas hasta resistencia bacteriana y graves efectos cancerígenos o teratogénos [5], [6]. Por ello, las agencias gubernamentales de inocuidad alimentaria y en el ámbito internacional agencias como el Codex Alimentarius han establecido las concentraciones o límites máximos de residuos (LMR) que debe contener un alimento para ser considerado inocuo para el consumo humano [7]-[10]. Los exportadores de productos acuícolas deben cumplir con los requisitos sanitarios de LMR, establecidos por las autoridades de los países de destino, para evitar posibles detenciones y rechazos de sus envíos debido a la presencia de residuos o contaminantes en cantidades superiores a las permitidas. Los LMR de los medicamentos veterinarios incluidos en el presente estudio varían desde 100 hasta 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; asimismo, el cloranfenicol y los beta-agonistas se encuentran prohibidos para uso en la producción animal, según lo establecido por el Código de Regulación de los Estados Unidos [7], por la Regulación Europea [8], [9] y por el Codex Alimentarius [10].

Los laboratorios que realizan ensayos de residuos de medicamentos veterinarios juegan un rol importante en el control de la inocuidad alimentaria de productos de acuicultura en el mercado nacional e internacional. En el Perú, la entidad encargada de realizar los controles oficiales de residuos de medicamentos veterinarios en los productos acuícolas es el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, que realiza muestreos en centros de producción y en lotes de exportación, y envía las muestras a laboratorios extranjeros para su análisis, debido a la no disponibilidad de laboratorios nacionales que realicen estos ensayos.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) es la técnica de referencia recomendada por la Unión Europea [11], [12] y por la guía de validación de la administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos [13] para realizar los análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, debido a su alta sensibilidad y selectividad, que permiten realizar el estudio simultáneo de diferentes grupos de fármacos y/o sus metabolitos en niveles de trazas, en el orden de partes por billón y en concentraciones menores de los LMR. La UPLC-MS/MS genera información de la estructura molecular de los analitos, a partir del monitoreo de los iones productos originados por la disociación de la molécula precursora, que se utiliza para confirmar la identidad de los analitos [11]-[13]. Esta característica de la UPLC-MS/MS ayuda a evitar o disminuir la ocurrencia de resultados falsos positivos o falsos negativos, que pueden originar problemas de detenciones o

rechazos de los envíos, así como pérdidas económicas y disputas legales en el comercio internacional de alimentos. Además, la UPLC-MS/MS permite realizar análisis multiresiduo para la detección y cuantificación simultánea de cientos de moléculas en una misma corrida, sin necesidad de una rigurosa separación cromatográfica, lo cual simplifica los procesos analíticos y facilita una rápida respuesta de los laboratorios de ensayo en el control de la inocuidad alimentaria [11].

La interferencia de matriz es una de las principales desventajas de la técnica UPLC-MS/MS, que se origina por la presencia de ciertos compuestos orgánicos de los alimentos que permanecen como impurezas en los extractos de las muestras y afectan la ionización de los analitos. Para superar esta interferencia se requiere realizar una exhaustiva limpieza de los extractos, mediante uno o más métodos de purificación, tales como la extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, extracción asistida por microonda o extracción acelerada por solventes. Sin embargo, los laboratorios que realizan análisis rutinarios requieren utilizar métodos sencillos con la finalidad de generar resultados rápidos para el control de la inocuidad alimentaria. La dSPE, introducida para el análisis de residuos de plaguicidas en frutos y vegetales [14], es actualmente la técnica de extracción y limpieza de muestras de mayor aceptación internacional en los laboratorios que realizan análisis para el control de la inocuidad alimentaria.

El presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar y validar un método de análisis sencillo, robusto y efectivo para la determinación multiresiduo de 30 medicamentos veterinarios pertenecientes a diferentes familias de fármacos (penicilinas, tetraciclinas, macrólidos, entre otros), en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y langostino (*Litopenaeus vannamei*). El método presentado en este artículo utiliza dSPE con C18 y un posterior análisis instrumental por UPLC-MS/MS.

Materiales y métodos

Estándares y reactivos

Para evaluar los medicamentos veterinarios de interés se utilizaron estándares de alta pureza (mayor de 99%). Los estándares de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, ácidonáldixico, enrofloxacin, ciprofloxacino, sulfamerazina, sulfacrolpiridazina, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfaquinolaxina, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina, espiramicina, eritromicina, trimetoprim, cimaterol, salbutamol, Terbutalina, ractopamina, zilpaterol, clenbuterol, florfenicon y cloranfenicol fueron adquiridos de Sigma Aldrich (San Luis, EE. UU.). Los estándares de amoxicilina y mapenterol fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

Los reactivos utilizados fueron de grado LC-MS o HPLC. Metanol y acetonitrilo fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, ácido fórmico de Fluka, sulfato de magnesio anhidro y acetato de sodio anhidro de JT Baker (Deventer, Holland) y agua ultrapura del equipo Milipore Mili-Q system (Milford, MA, EE. UU.).

Las soluciones individuales concentradas de 2000 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (soluciones *stock*) de cada estándar de medicamento fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada de cada estándar primario en acetonitrilo, metanol o agua ultrapura. Las soluciones fueron almacenadas a -20°C en la oscuridad. Las soluciones de mezclas estándares de 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ fueron preparadas tomando una alícuota de cada una de las soluciones *stock* y disolviéndolas en acetonitrilo, con excepción de los betalactámicos, en los cuales se utilizó agua para la disolución y almacenamiento en viales plásticos, a fin de evitar problemas de absorción en vidrio de los antibióticos. Las soluciones de calibración de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ fueron preparadas disolviendo en acetonitrilo una cantidad apropiada de las soluciones de mezclas de estándares de 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Preparación de las muestras

Las muestras de truchas y langostinos fueron obtenidas de empresas locales dedicadas a la acuicultura. Fueron mantenidas en almacenamiento a -20 °C y protegidas de la luz hasta su preparación para el análisis. Así mismo, fueron descongeladas y llevadas a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos. Se procedió a la molienda de langostinos (sin cabeza y antenas) y trucha (solo músculo) utilizando el homogenizador Robot coupe Blixer 3.0. Luego se realizó la extracción de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 2,00 g de músculo de trucha o langostino dentro de tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL, luego se agregaron 10 mL de acetonitrilo/EDTA 0.1 M en agua (4/1%v/v) y se homogeneizó con un equipo vortex por 5 min, luego se procedió a centrifugar por 5 min a 4000 rpm, el sobrenadante se trasvasó a un tubo de 50 mL que contenía 300 mg de adsorbente C18; luego se adicionaron 10 mL de hexano presaturado en acetonitrilo, se agitó por 30 s y se procedió a centrifugar nuevamente por 5 min a 4000 rpm. Se eliminó la capa de hexano con una pipeta Pasteur, del sobrenadante que quedó se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL. Finalmente, se concentró el extracto a sequedad, en un equipo de evaporación de nitrógeno a 45 °C. El extracto evaporado fue reconstituido con 1 mL de fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua), se filtró a través de filtros de difluoruro de polivinilo (PDVF) de 0,2 µm y se colocó en viales de color ámbar. Finalmente, se inyectaron 2 µL en el equipo de UPLC-MS/MS.

Análisis por UPLC-MS/MS

El análisis por cromatografía se realizó con el equipo Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y la separación de los analitos se realizó con la columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm). Para la corrida cromatográfica se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0,1% en agua ultrapura (Fase A) y 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B) con un flujo de 0,5 mL/min. El gradiente de elución inició con 0% fase móvil B por 0,1 min, que se incrementó en forma lineal hasta 100% en 7,9 min, y se mantuvo por 1,5 min antes de regresar a la condición inicial en 0,1 min, con un tiempo de preequilibración de 3,4 min. El tiempo de la corrida cromatográfica fue de 13 min, el volumen de inyección fue de 2 µL y la temperatura de la columna fue de 40 °C.

El análisis por espectrometría de masas se realizó con el equipo UPLC-MS/MS Acquity Xevo TQ-XS (Waters, Manchester, Reino Unido). El equipo fue operado utilizando la fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo ESI positivo. Los parámetros para la fuente de ionización fueron: voltaje de capilar 3,0 kV, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo del gas de cono 150 L/h y flujo del gas de desolvatación 1000 L/h. La colisión inducida por disociación se realizó utilizando argón como gas de colisión, a una presión 4 x mbar en la celda de colisión. La adquisición y procesamiento de datos en el equipo UPLC-MS/MS se realizó con el programa MassLynx 4.2. En la Tabla 1 se muestran los principales parámetros de espectrometría de masa MS/MS por cada analito determinado.

Validación del método

La validación del método se realizó con la finalidad de verificar el funcionamiento analítico del método desarrollado para el uso propuesto, es decir, el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en productos acuícolas (truchas y langostinos). La validación se realizó de acuerdo al procedimiento de la Regulación Unión Europea 2002/657 [11] y Eurachem [15]. Para ello, se utilizó muestra de blancos de matriz de truchas y langostinos fortificados con cantidades apropiadas de la solución de estándares de trabajo para obtener tres niveles de concentraciones de 10, 50 y 100 µg/kg, con 10 análisis repetidos por cada nivel. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorio, se realizaron los análisis en tres ocasiones diferentes, con tres analistas. La linealidad fue evaluada utilizando curva de calibración fortificada en blanco de matriz en 5 niveles de concentración de 10 µg/kg hasta 300 µg/kg. Los límites de detección (LoD) y de cuantificación (LoQ) fueron estimados utilizando blancos de matriz fortificados a la concentración de 10 µg/kg, con 10 análisis repetidos.

La evaluación de la selectividad del método por UPLC-MS/MS se realizó mediante adquisición por espectrometría de masa en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM), con dos iones productos por cada compuesto. La proporción de las señales de los iones productos (relaciones iónicas) de cada compuesto se halló dividiendo las señales del ion menos abundante entre el ion más abundante. La identificación de los compuestos por UPLC-MS/MS se realizó según los requisitos de relación iónica establecidos por Codex [13].

Tabla 1. Ventanas de tiempo de retención (t_R) y condiciones MS/MS de los analitos incluidos en el estudio.

	Analito	Grupo farmacológico	Ventana t_R (min)	Cono (V)	Ion precursor (m/z)	Iones productos (m/z)			
						Cuantía (m/z)	ECb (eV)	Cualic (m/z)	EC (eV)
1	Oxitetraciclina	Tetraciclinas	1,98 – 2,78	40	461v3	426,3	18	443,3	12
2	Clortetraciclina	Tetraciclinas	2,59 – 3,39	20	479,4	444,2	20	462,2	15
3	Tetraciclina	Tetraciclinas	2,11 – 2,91	20	445,3	410,3	18	153,7	25
4	Enrofloxacino	Quinolonas	2,14 – 2,94	52	360,2	316,2	18	245	24
5	Flumequina	Quinolonas	3,79 – 4,59	40	262	244	18	201,8	32
6	Ciprofloxacino	Quinolonas	1,98 – 2,78	50	332,3	288,1	16	244,9	22
7	Ácido nalidíxico	Quinolonas	3,66 – 4,46	6	233	214,9	14	186,8	22
8	Ácido oxolínico	Quinolonas	3,05 – 3,85	24	262	244	18	159,7	34
9	Sulfamerazina	Sulfonamidas	2,04 – 2,84	34	265	91,6	26	155,7	16
10	Sulfaclorpiridazina	Sulfonamidas	2,62 – 3,42	40	285,3	155,7	12	91,5	28
11	Sulfadiazina	Sulfonamidas	1,75 – 2,55	42	251	155,7	12	91,6	22
12	Sulfametoxazol	Sulfonamidas	2,78 – 3,58	10	254	155,7	14	91,5	24

Tabla 1. Ventanas de tiempo de retención (t_R) y condiciones MS/MS de los analitos incluidos en el estudio.

	Analito	Grupo farmacológico	Ventana t_R (min)	Cono (V)	Ion precursor (m/z)	Iones productos (m/z)			
						Cuantia (m/z)	ECb (eV)	Cualic (m/z)	EC (eV)
13	Sulfaquinolaxina	Sulfonamidas	3,23 – 4,03	54	301,1	155,7	14	91,5	34
14	Sulfametazina	Sulfonamidas	2,29 – 3,09	42	279,1	185,8	16	123,7	25
15	Sulfatiazol	Sulfonamidas	1,84 – 2,64	38	256	155,7	15	91,5	26
16	Sulfadimetoxina	Sulfonamidas	3,22 – 4,02	56	311,1	155,7	22	91,5	32
17	Sulfametoxipiridazina	Sulfonamidas	2,30 – 3,10	46	281	155,7	15	91,5	26
18	Sulfadoxina	Sulfonamidas	2,77 – 3,57	44	311,1	155,7	16	91,5	26
19	Cimaterol	B-agonistas	1,33 – 2,13	22	220	159,8	16	142,7	23
20	Salbutamol	B-agonistas	1,27 – 2,07	34	240,1	147,7	18	165,8	12
21	Terbutalina	B-agonistas	1,26 – 2,06	16	226	151,8	14	106,6	28
22	Ractopamina	B-agonistas	2,04 – 2,84	35	302,2	163,8	15	284,2	12
23	Zilpaterol	B-agonistas	1,26 – 2,06	20	262,1	244,1	12	184,9	23
24	Clembuterol	B-agonistas	2,33 – 3,13	8	277	202,8	14	131,7	24
25	Mapenterol	B-agonistas	2,95 – 3,75	22	325,2	236,9	14	307,1	10
26	Espiramicina	Macrólidos	2,45 – 3,25	20	422,5	173,9	20	100,6	15
27	Amoxicilina	Penicilinas	1,26 – 2,06	6	366,3	349,2	6	113,5	18
28	Florfenicol	Fenicoles	2,82 – 3,62	25	358,2	240,8	16	205,8	26
29	Trimetoprim	Trimetoprim	1,88 – 2,68	40	291,1	230	22	122,6	28
30	Cloranfenicol	Fenicoles	3,01 – 3,81	30	323,2	275	12	164,8	22

^aIon producto más abundante utilizado para el análisis cuantitativo.

^bEnergía de colisión.

^cIon producto segundo en abundancia, utilizado para la detección cualitativa.

La estimación de la incertidumbre se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la Guía ISO o método GUM [16] y Eurachem [17]. La estimación de la incertidumbre combinada se calculó a partir de la Ec. (1):

$$u_c = (c) \sqrt{\left(\frac{u_{Co}}{Co}\right)^2 + \left(\frac{u_{Ve}}{V_e}\right)^2 + \left(\frac{u_F}{F}\right)^2 + \left(\frac{u_W}{W}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{C}\right)^2} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde C=contenido en la muestra en $\mu\text{g}/\text{kg}$, Co=concentración en el extracto en ng/mL obtenida por interpolación en la curva de calibración, Ve=volumen del extracto, W=peso de la muestra, F=factor de concentración y R=repetibilidad. La incertidumbre expandida se calculó multiplicando la incertidumbre combinada por $K=2$, considerando un nivel de confianza de 95%.

La evaluación de los parámetros de validación se realizó de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos por el Codex Alimentarius [13], con RSD menor de 20% para la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio y con recuperación de 70% a 120% para la veracidad. La selectividad del método se evaluó comparando los cromatogramas de los blancos de matriz *versus* los blancos de matriz fortificados, verificando que no hubiera señales interferentes en la región en donde eluyen los analitos. Asimismo, se realizó la confirmación por espectrometría de masas comparando la relación iónica de dos fragmentos MS/MS de cada molécula, verificando que las relaciones iónicas de las muestras estuvieran dentro del intervalo de aceptabilidad, en comparación con los estándares establecidos por el Codex Alimentarius [13].

Resultados y discusión

Análisis por UPLC-MS/MS

La optimización de los parámetros de espectrometría de masa MS/MS fue realizada mediante infusión directa en el espectrómetro de soluciones de cada uno de los estándares de medicamentos veterinarios, a la concentración de 0,5 mg/L. El electrospray fue utilizado en modo ion positivo, puesto que todos los analitos presentaban mayor señal en este modo de ionización. En la Tabla 1 se muestran las condiciones del espectrómetro de masas utilizadas en el estudio. En cuanto a la condiciones cromatográficas, fueron desarrolladas principalmente para optimizar la forma de pico, resolución e intensidad de los analitos. La fase móvil fue investigada principalmente para maximizar la sensibilidad y la resolución del método. Se probaron diferentes solventes polares, tales como metanol o acetonitrilo y agua ultrapura, todos con concentraciones de ácido fórmico al 0,05 y 0,1% (v/v). El acetonitrilo presentó mayor sensibilidad para los analitos y el ácido fórmico favoreció la ionización de los analitos. De igual manera, se configuró el tiempo de monitoreo de cada transición (*dwell time*) utilizando el programa MassLynx 4.2, con la finalidad de obtener como mínimo 15 puntos en cada pico cromatográfico.

En la Figura 1 se muestra el cromatograma de ion total (TIC) para la matriz trucha. Los tiempos de retención de los compuestos en las matrices de trucha y langostino fueron similares; variaron desde 1,66 hasta 4,19 minutos. La gradiente utilizada sirvió para la separación de los analitos en menos de 5 minutos. A pesar de que algunos compuestos coeluyen, ello no constituyó problema para su cuantificación, debido a la alta selectividad de la técnica de UPLC-MS/MS, puesto que estos compuestos son separados y detectados mediante adquisición de monitoreo de reacción múltiple por espectrometría de masas en tándem.

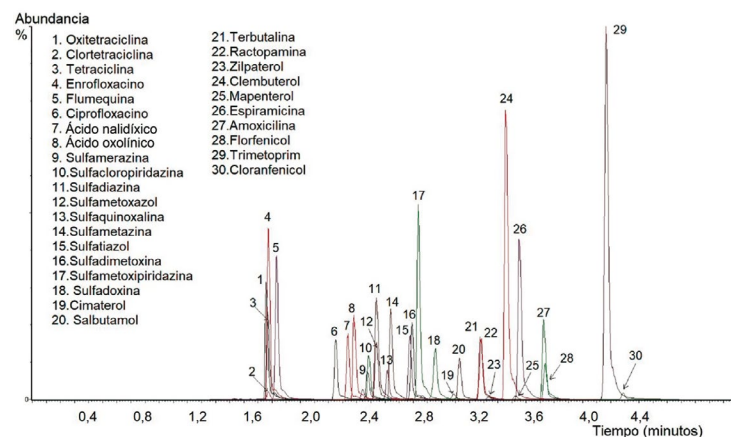


Figura 1. Cromatogramas de ion total (TIC) de 30 residuos de medicamentos veterinarios, fortificados a 100 µg/kg en blanco de matriz de trucha.

Validación del método

Después de determinar las condiciones de extracción, de separación cromatográfica y de detección por espectrometría de masas, se validó el método de análisis, determinándose los parámetros de recuperación, repetitividad, reproducibilidad intralaboratorio, linealidad, LoD, LoQ, selectividad e incertidumbre.

Recuperación

En las Tablas 2 y 3 se observa que los porcentajes de recuperación variaron desde 76,8 hasta 120,5%, valores que se encuentran dentro de la especificación establecida por el Codex Alimentarius, es decir, entre 70 y 120%.

Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

En las Tablas 2 y 3 se observa que la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, expresadas como % RSD, variaron desde 0,6% hasta 12,8%, con lo que se cumple con los criterios del Codex Alimentarius que establecen un % RSD < 20%. Cabe destacar que dichos porcentajes se encuentran en línea con otros estudios, en los cuales se validó la técnica analítica en matrices como pescados y langostinos, en los que se obtuvieron % RSD superiores a 20 % [18]-[21].

Tabla 2. Recuperación, repetibilidad (%RSD_r) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD_R) obtenidos en trucha fortificada a 10, 50 y 100 µg/kg.

Analito	10 µg/kg			50 µg/kg			100 µg/kg		
	R ^a	RSD _r ^b	RSD _R ^c	R	RSD _r	RSD _R	R	RSD _r	RSD _R
1. Oxitetraciclina	100	1,9	5,4	91	11,0	11,5	93	2,3	14,1
2. Clortetraciclina	104	7,1	7,0	96	4,9	4,2	98	4,0	5,5
3. Tetraciclina	98	4,0	6,0	91	12,8	12,6	93	1,8	13,8
4. Enrofloxacino	93	2,8	8,7	97	8,8	10,4	99	2,1	12,1
5. Flumequina	106	3,6	4,1	93	9,5	10,6	98	1,0	10,1
6. Ciprofloxacino	93	5,7	5,3	96	9,1	9,5	97	2,2	10,1
7. Ácido nalidíxico	95	1,5	2,2	95	8,6	10,9	99	1,1	11,6
8. Ácido oxolínico	91	3,5	3,4	98	9,9	11,2	101	1,7	11,2
9. Sulfamerazina	89	3,9	5,3	101	7,2	9,2	107	3,3	9,3
10. Sulfacloropiridazina	99	3,1	5,9	95	5,7	7,4	100	2,4	9,5
11. Sulfadiazina	100	2,8	4,8	95	12,7	12,8	99	1,8	12,5
12. Sulfametoxazol	100	2,3	3,4	96	4,0	6,4	101	2,0	7,0
13. Sulfaquinoxalina	98	3,3	5,6	92	9,1	10,9	98	1,6	10,3
14. Sulfametazina	100	2,9	3,2	90	11,2	11,2	96	1,6	11,6
15. Sulfatiazol	96	2,8	5,2	92	9,3	10,4	98	1,6	11,0
16. Sulfadimetoxina	96	3,6	6,8	89	10,7	14,0	95	1,3	15,0
17. Sulfametoxipiridazina	103	1,6	3,4	95	10,4	12,0	101	2,8	12,0
18. Sulfadoxina	103	3,0	3,5	95	5,2	7,2	99	1,9	8,5
19. Cimaterol	77	2,8	3,6	98	5,6	7,1	101	1,6	8,9
20. Salbutamol	84	1,5	3,3	108	2,7	3,0	106	1,0	4,4
21. Terbutalina	82	4,2	4,5	106	2,2	3,0	104	1,8	4,1
22. Ractopamina	88	2,8	9,9	109	2,3	3,7	109	1,1	4,1
23. Zilpaterol	93	3,1	3,5	101	4,6	4,4	100	1,6	6,1
24. Clembuterol	96	1,9	2,8	103	2,3	1,9	106	1,5	2,7

Tabla 2. Recuperación, repetibilidad (%RSDr) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD_R) obtenidos en trucha fortificada a 10, 50 y 100 µg/kg.

	Analito	10 µg/kg			50 µg/kg			100 µg/kg		
		R ^a	RSDr ^b	RSD _R ^c	R	RSDr	RSDR	R	RSDr	RSDR
25	Mapenterol	92	3,2	4,1	99	2,3	2,8	103	1,4	5,0
26	Espiramicina	100	3,3	3,3	98	2,8	3,0	103	2,7	4,8
27	Amoxicilina	103	3,5	4,4	95	4,3	3,7	96	2,1	6,4
28	Florfenicol	99	5,8	7,2	97	6,2	6,3	100	1,9	8,0
29	Trimetoprim	89	2,1	4,9	111	2,5	2,5	110	1,4	3,9
30	Cloranfenicol	90	6,4	7,1	94	8,4	8,1	98	3,4	11,2

^aRecuperación de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

^bDesviación estándar relativa de 10 análisis en condiciones de repetibilidad (n = 10) (%).

^cDesviación estándar relativa de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

Tabla 3. Recuperación, repetibilidad (%RSDr) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD_R) obtenidos en langostino fortificado a 10, 50 y 100 µg/kg.

	Analito	10 µg/kg			50 µg/kg			100 µg/kg		
		R _a	RSDr _b	RSDR _c	R	RSDr	RSDR	R	RSDr	RSDR
1	Oxitetraciclina	113	2,4	4,4	80	2,2	6,3	100	1,6	8,1
2	Clortetraciclina	116	4,6	4,3	81	9,0	9,8	97	6,1	6,9
3	Tetraciclina	115	2,6	3,2	82	3,8	4,6	99	1,8	5,4
4	Enrofloxacino	113	2,1	3,4	82	2,7	5,1	97	2,0	6,2
5	Flumequina	109	4,7	6,5	79	4,7	3,7	97	1,6	3,3
6	Ciprofloxacino	109	5,1	7,1	80	4,1	5,9	96	1,9	6,5
7	Ácido nalidixico	112	2,5	3,4	82	2,1	2,6	100	1,0	2,8
8	Ácido oxolínico	113	1,9	3,0	84	1,5	2,5	103	1,8	3,6
9	Sulfamerazina	92	2,8	5,2	99	2,1	3,5	111	1,9	4,5
10	Sulfacloropiridazina	114	2,8	4,5	82	2,2	4,2	98	1,4	5,2
11	Sulfadiazina	110	3,1	4,8	88	2,2	2,1	101	2,5	2,4
12	Sulfametoxazol	117	3,4	2,4	83	2,6	2,6	99	1,4	1,9
13	Sulfaquinoxalina	116	3,2	6,1	79	1,9	3,6	101	1,5	4,2
14	Sulfametazina	102	3,4	4,6	91	3,4	3,4	107	1,2	3,2
15	Sulfatiazol	107	2,2	2,7	85	2,0	4,1	100	2,0	2,3
16	Sulfadimetoxina	113	0,8	2,9	81	1,6	3,9	99	1,6	3,9
17	Sulfametoxipiridazina	104	3,8	3,5	89	2,4	3,4	105	3,2	3,6
18	Sulfadoxina	115	2,4	2,4	84	1,1	2,2	100	2,1	3,9
19	Cimaterol	102	2,5	3,9	89	1,1	3,2	101	1,7	3,6
20	Salbutamol	111	1,8	3,4	85	0,6	1,9	96	1,0	2,2
21	Terbutalina	109	1,7	2,2	88	1,5	3,9	97	2,4	4,1
22	Ractopamina	115	2,1	4,4	81	2,1	3,6	101	1,4	5,0
23	Zilpaterol	114	1,4	4,4	86	1,9	4,4	99	1,2	4,1
24	Clembuterol	114	1,5	2,2	83	2,3	2,7	101	1,2	3,4
25	Mapenterol	112	1,4	3,0	82	1,7	3,6	99	2,3	4,8
26	Espiramicina	112	1,5	2,8	89	2,2	3,5	90	1,7	4,5
27	Amoxicilina	118	2,1	5,1	86	2,5	6,6	86	4,0	5,8
28	Florfenicol	121	9,0	10,6	88	6,3	6,0	103	3,6	4,8
29	Trimetoprim	107	2,0	4,0	87	2,3	3,5	104	2,1	4,1
30	Cloranfenicol	114	5,0	11,1	83	4,9	6,9	99	3,6	4,9

^aRecuperación de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

^bDesviación estándar relativa de 10 análisis en condiciones de repetibilidad (n = 10) (%).

^cDesviación estándar relativa de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

Límites de detección y de cuantificación

El LoD y el LoQ hallados en trucha y langostinos variaron desde 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la Figura 2 se observa que la mayoría de los LoQ de los medicamentos incluidos fueron menores de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a excepción de cloranfenicol y florfenicol en langostino, que fueron de 12,7 y 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Dichos valores están muy por debajo de los LMR de estos compuestos, que varían desde 50 hasta 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a excepción del cloranfenicol y los compuestos beta-agonistas, medicamentos prohibidos para uso en animales para consumo humano y para los que no se han establecido sus respectivos LMR.

Los LoQ hallados para cloranfenicol fueron de 6,4 y 12,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para trucha y langostino, respectivamente, superiores al límite de performance mínimo requerido de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido para cloranfenicol por la Regulación Europea [6], lo que se explicaría por el hecho de que, al haberse utilizado un método multiresiduo, no se puede aplicar condiciones de sintonización del espectrómetro de masas, condiciones cromatográficas y condiciones de extracción específicas con la finalidad de incrementar la sensibilidad del método para esta molécula. Por ello, lo recomendable sería realizar un método individual para el análisis del cloranfenicol, con la finalidad de obtener límites analíticos menores o iguales a lo requerido. Una situación diferente se observó para el florfenicol, para el cual se obtuvo LoQ de 7,2 y 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para trucha y langostino, respectivamente, similares al cloranfenicol, por lo que estos límites analíticos obtenidos serían adecuados para el análisis de florfenicol, debido a que están muy por debajo del LMR, que es de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Hay que remarcar que en investigaciones previas se han reportado valores de LoD y LoQ similares o por debajo de lo hallado en el presente estudio [18]-[26].

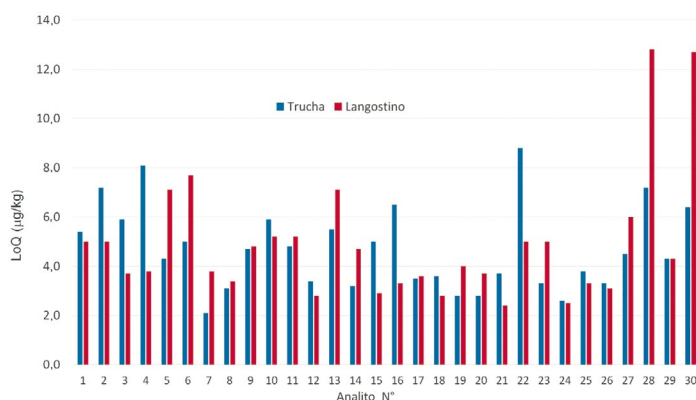


Figura 2. Límite de cuantificación (LoQ) ($\mu\text{g}/\text{kg}$) del método en trucha y langostino.

Linealidad

Los coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración de los medicamentos veterinarios fortificados en trucha y langostino fueron menores de 0,99; con excepción de sulfaquinoxalina en langostino, que fue de 0,97. En la Figura 3 se observan las curvas de calibración para la matriz trucha de compuestos representativos de los principales grupos de fármacos veterinarios incluidos en el estudio de validación.

Selectividad

La selectividad del método se evidenció mediante identificación por LC-MSMS de los medicamentos veterinarios incluidos en el estudio, dado que las relaciones iónicas de los compuestos cumplieron con los rangos de aceptación del Codex [13]. En la Figura 4 se muestran los cromatogramas

MRM de los compuestos representativos fortificados en blanco de matriz trucha, en los que se observa que el monitoreo de dos iones fragmentos característicos de la estructura molecular de cada compuesto le confiere una alta selectividad a la técnica de UPLC-MS/MS. Asimismo, se identificaron las moléculas por el tiempo de retención (TR). Por otro lado, se observó efecto de arrastre en los compuestos del grupo de las quinolonas, vale decir, ácido nalidixico, ácido oxolínico, enrofloxacin y ciprofloxacina. Para superar este efecto, se requeriría investigar los métodos de lavado del inyector utilizando diferentes solventes y tiempos de lavado. Sin embargo, debe puntualizarse que el efecto de arrastre fue insignificante y no afectó a la cuantificación de dichos compuestos en las matrices de langostino y trucha.

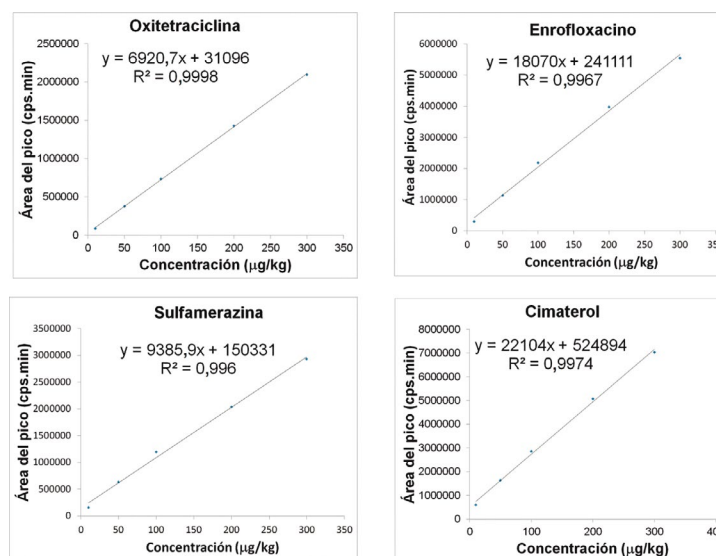


Figura 3. Curva de calibración de compuestos representativos fortificados en blanco de matriz de trucha.

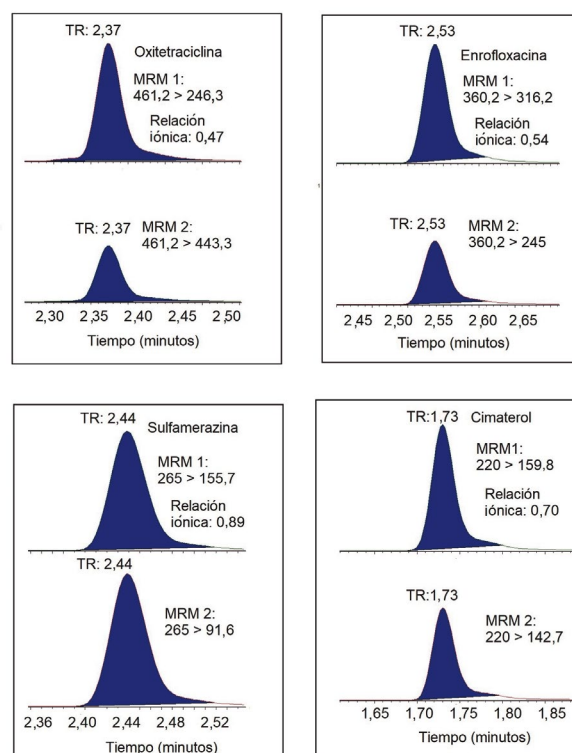


Figura 4. Cromatogramas MRM de compuestos representativos fortificado a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en blanco de matriz de trucha. TR: tiempo de retención; MRM: monitoreo de reacción múltiple.

Incertidumbre

La incertidumbre expandida de los medicamentos veterinarios incluidos en el estudio de validación varió desde 8% a 59% para trucha y langostino, con excepción del compuesto sulfaquinoxalina en langostino, para el que se obtuvo un valor de 98%, debido principalmente a la alta contribución de la incertidumbre de la curva de calibración, tal como se observa en la Figura 5, lo que se originó probablemente debido a errores aleatorios o sistemáticos en la preparación de la curva de calibración.

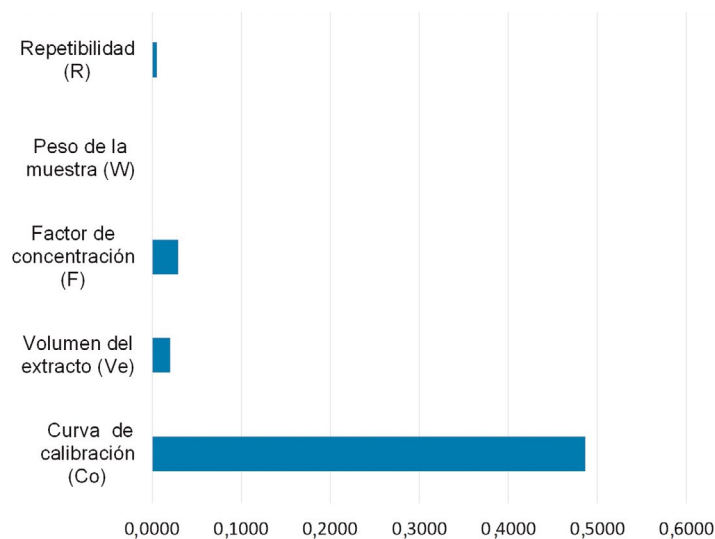


Figura 5. Fuentes de incertidumbre estándar relativa de sulfaquinoxalina en langostino a 50 µg/kg.

Análisis en muestras reales

Una vez desarrollado el método, fue aplicado para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en 6 muestras de trucha, las cuales fueron recolectadas en 6 supermercados diferentes del Cercado de Lima, Perú. Con el fin de asegurar la calidad de los resultados, se fortificó una muestra blanco a la concentración de 50 µg/kg antes de comenzar con la extracción. Además, el tiempo de retención, los fragmentos de cuantificación y confirmación y el ratio iónico encontrados en las muestras de mercado fueron comparados con los de los estándares de calibración, para su correcta identificación y cuantificación, tal como lo establece la Decisión de la Comisión 657/2002/CE [11]. Se reportaron trazas del medicamento oxitetraciclina en una de las 6 muestras, la cual se encontraba muy por debajo del LMR de 100 µg/kg. Dichos resultados concuerdan con otros trabajos de investigación reportados previamente utilizando la misma técnica analítica, en los que se detectaron pocos analitos en muestras de trucha [18]-[21].

Conclusiones

El estudio cumplió con el objetivo de desarrollar y validar un método de análisis sencillo, robusto y efectivo para la determinación multirresiduo de múltiples medicamentos veterinarios pertenecientes a diferentes familias de fármacos, en trucha y langostino. El método, que utiliza dSPE con C18 y detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, cumplió con los criterios de validación establecidos por el Codex Alimentarius. Los resultados obtenidos nos permiten recomendar la aplicación del método en los programas nacionales de monitoreo de la inocuidad de truchas y langostinos provenientes de acuicultura.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA) y a la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) por el financiamiento y por el apoyo durante el desarrollo de la investigación. Al CITEacuicola UPCH por haber facilitado los recursos humanos, la infraestructura y los equipos de su Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria para la realización del estudio.

Referencias

- [1] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura, “El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción”, 2020. <https://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>. [Último acceso: 07 03 2022].
- [2] P. van der Sleen *et al.*, “Interannual temperature variability is a principal driver of low-frequency fluctuations in marine fish populations”, *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-8, 2022. DOI: <https://10.1038/s42003-021-02960-y>
- [3] ComexPerú-Sociedad de Comercio Exterior del Perú, “Exportaciones acuícolas crecieron un 25,3% en el período enero-octubre de 2021”, 2022. <https://www.comexperu.org.pe/articulo/exportaciones-acuicolas-crecieron-un-253-en-el-periodo-enero-octubre-de-2021>. (Último acceso: 08 03 2022).
- [4] D. Schar, E. Klein, R. Laxminarayan, M. Gilbert, and T. Van Boeckel, “Global trends in antimicrobial use in aquaculture”, *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
- [5] F. M. Treiber and H. Beranek-Knauer, “Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide”, *Antibiotics*, vol. 10, no. 5, pp. 1-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050534>.
- [6] D. Schar, C. Zhao, Y. Wang, D. G. J. Larsson, M. Gilbert, and T. P. Van Boeckel, “Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia”, *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25655-8>. PMID: 34508079.
- [7] Administrative Committee of the Federal Register, “Electronic Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drugs. Part 556. Tolerances For Residues Of New Animal Drugs In Food”, 2022. https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=45a74e7727c3e71d2325986fd8064238&mc=tru e&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfr556_main_02.tpl. [Último acceso: 15 02 2022].
- [8] H. N. Jung, D. H. Park, J. Y. Choi, S. H. Kang, H. J. Cho, J. M. Choi, J. H. Shim, A. A. Zaky, A. M. Abd El-Aty, and H. C. Shin, “Simultaneous Quantification of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol, and Florfenicol Amine in Animal and Aquaculture Products Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Front. Nutr.*, vol. 8, no. 812803, pp. 1-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.812803>.
- [9] T. J. Centner and L. Petetin, “Divergent Approaches Regulating Beta Agonists and Cloning of Animals for Food: USA and European Union”, *Society & Animals*, vol. 28, no. 5-6 pp. 613-32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685306-12341567>.
- [10] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud, “Codex Alimentarius. CX/MRL 2-2018. Límites Máximos de Residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos”, 2018. <https://onx.la/73b7f> [Último acceso: 15 02 2022].
- [11] Official Journal of the European Union. “Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC”, 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32021R0808>. [Último acceso: 08 03 2022].

- [12] FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee, “Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products”, Fda.gov, 2019. <https://www.fda.gov/media/81810/download>. [Último acceso: 08 03 2022].
- [13] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud, “CAC/GL 71-2009. Adoptadas en 2009. Revisadas en 2012, 2014. Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos”, 2014. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXG_071s.pdf. [Último acceso: 15 02 2022].
- [14] S. Dugheri, N. Mucci, G. Cappelli, L. Trevisani, A. Bonari, E. Bucletti, D. Squillaci, and G. Arcangeli, “Advanced Solid-Phase Microextraction Techniques and Related Automation: A Review of Commercially Available Technologies”, *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2022, pp.1-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/8690569>.
- [15] B. Magnusson and U. Örnemark, “The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, 2014. ISBN 978-91-87461-59-0. www.eurachem.org. [Último acceso: 15 02 2022].
- [16] International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission, “ISO/IEC GUIDE 98-3:2008. Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)”, 1995. https://isotc.iso.org/livelink/livelink/fetch/2000/2122/4230450/8389141/ISO_IEC_Guide_98%2D3_2008%28E%29_%2D_Uncertainty_of_measurement_%2D%2D_Part_3%2C_Guide_to_the_expression_of_uncertainty_in_measurement_%28GUM%2C1995%29.pdf?nodeid=8389142&vernum=-2. [Último acceso: 15 02 2022].
- [17] S. L. R. Ellison and A. Williams, “EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”, 2012. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf. [Último acceso: 15 02 2022].
- [18] C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, R. Puchades, B. Company, J. Miralles, and A. Moreno, “Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS”, *Aquac. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 993-99, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.008>.
- [19] A. Juan-García, G. Font, and Y. Picó, “Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS”, *Electrophoresis*, vol. 28, no. 22, pp. 4180-91, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200700383>.
- [20] M. E. Dasenaki and N. S. Thomaidis, “Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 672, no. 1-2, pp. 93-102, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.034>. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20579496.
- [21] R. Pereira Lopes, R. Cazorla Reyes, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, and A. Garrido Frenich, “Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 895-896, pp. 39-47, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.011>.
- [22] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, and A. R. Rodriguez, “Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: I. Laboratory-validated method”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1088, no. 1-2, pp. 32-39, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.057>.
- [23] M. P. Hermo, D. Barron, and J. Barbosa, “Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples. High-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1201, no. 1, pp. 1-14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.090>.
- [24] G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, and A. R. Rodriguez, “Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography– tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 952, no. 1-2, pp.121-29, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00092-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00092-4).
- [25] P. Mottier, Y. A. Hammel, E. Gremaud, and P. A. Guy, “Quantitative high-throughput analysis of 16 (fluoro)quinolones in honey using automated extraction by turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatograph- tandem mass spectrometry”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 35-43, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf072934d>.
- [26] S. Bogialli, G. D’Ascenzo, A. Di Corcia, A. Lagana, and G. Tramontana, “Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1216, no. 5, pp. 794-780, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.070>.

Citación de Artículo:

D. Chirinos -Pajuelo, O.L. Aguirre, W. León-Gonzales, N. E. Hurtado-Galindo, E. Morales-Ochante, L. Huicho & M.Rivera-Ch, “Validación de un método multirresiduo para la determinación de medicamentos veterinarios en trucha y langostino”, *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 16-24, 2022. DOI:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.101096>